



Trabalho Final

Mestrado Integrado em Medicina

Clínica Universitária de Gastroenterologia

Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) –
Métodos não invasivos

Sílvia Isabel Serrasqueiro Serrano

Dezembro de 2016



Trabalho Final

Mestrado Integrado em Medicina

Clínica Universitária de Gastroenterologia

**Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) –
Métodos não invasivos**

Sílvia Isabel Serrasqueiro Serrano

Orientadora:: Prof. Doutora Helena Cortez- Pinto

Dezembro de 2016

Índice

Índice	3
Índice de Ilustrações	4
Resumo	5
Abstract.....	5
Introdução.....	7
Métodos não invasivos	10
1. Métodos não imagiológicos.....	10
1.1 Métodos bioquímicos	10
1.1.1 Função Hepática	10
1.1.2 Relação AST/ALT	10
1.1.3 AST/Plaquetas (Índice de APRI).....	11
1.2 Marcadores relacionados com a fisiopatologia	11
1.2.1 Marcadores de apoptose	11
1.2.2 Marcadores inflamatórios	12
1.2.3 Marcadores oxidativos.....	13
1.2.4 Marcadores de fibrose	14
1.2.5 Lipotoxicidade	15
1.3 Scores - Combinação de variáveis	15
1.3.1 SteatoTest (ST).....	16
1.3.2 Fatty Liver Index (FLI).....	16
1.3.3 NAFLD Liver Fat Score	16
1.3.4 NAFLD fibrosis score (NFS)	17
1.3.5 FibroTest (FT)	17
1.3.6 FibroMeter NAFLD.....	18
1.3.7 BARD score.....	18
1.3.8 FIB-4,.....	18
1.3.9 Hepascore	18
1.3.10 Enhanced Liver Fibrosis (ELF)	19
2. Métodos Imagiológicos	20
2.1 Elastografia Transitória (TE) – FibroScan®	21
2.2 Técnica de radiação acústica (ARFI)	23
2.2.1 pSWE /ARFI	23
2.2.2. Elastografia onda 2D-cisalhamento (2D-SWE)	24
2.3 Ressonância Magnética (RM)	25
2.3.1 RM por imagem.....	25
2.3.2 Elastografia por Ressonância Magnética (RME)	25
2.3.3 Espectroscopia por RM (RMS)	26
2.4 Tomografia Computorizada (TC).....	26
2.5 Coeficiente de Atenuação Controlada (CAP)	26
Perspetivas Futuras	27
1. Marcadores Genéticos	27
2. Glicoproteínas.....	28
3. Alterações no RNA.....	29
4. Micropartículas (MPs).....	29
5. Compostos orgânicos voláteis - Testes respiratórios.....	29
6. Vias da morfogénese	30
7. Vesículas Extra- Celulares.....	30

Conclusão	31
Anexos.....	33
Bibliografia.....	38

Índice de Ilustrações

Tabela 1 Vantagens e desvantagens dos métodos não imagiológicos para o diagnóstico de doentes com FGNA.	333
Tabela 2 Vantagens e desvantagens dos métodos imagiológicos para o diagnóstico de doentes com FGNA	34
Tabela 3 Scores desenvolvidos para o diagnóstico de esteatose.	35
Tabela 4 Scores desenvolvidos para o diagnóstico de esteato hepatite não alcoólica....	36
Tabela 5 Scores desenvolvidos para o diagnóstico de Fibrose.....	37

Resumo

Uma das doenças hepáticas crônicas mais comuns é o Fígado Gordo não Alcoólico (FGNA), cuja morbidade tem aumentado rapidamente a nível global. O FGNA compreende um espectro de características histopatológicas que variam desde a Esteatose Hepática (EH) à Esteato-Hepatite não Alcoólica (EHNA), que é caracterizada por lesão inflamatória hepatocelular e variáveis graus de fibrose que podem progredir para cirrose. A fibrose é o fator de prognóstico mais importante na avaliação da progressão da doença hepática. O diagnóstico precoce é muito importante com o intuito de prevenir o desenvolvimento de cirrose e das suas complicações. A biópsia hepática é considerada o gold-standard para o diagnóstico e diferenciação entre Esteatose e EHNA e para estadiamento da fibrose hepática, apesar de ser um exame invasivo com algumas limitações e riscos. Os métodos não imagiológicos, as características clínicas e os exames bioquímicos assim como os métodos de imagem são alguns métodos alternativos de exames não invasivos. A melhor compreensão da fisiopatologia da EHNA e os avanços tecnológicos têm conduzido ao desenvolvimento de novos métodos que no futuro podem vir a ser uma alternativa à biópsia hepática. Esta revisão tem como objetivo analisar os benefícios e progressos dos métodos não-invasivos no diagnóstico e avaliação do prognóstico da EHNA.

Palavras-Chave: Esteato-hepatite não alcoólica; Esteatose Simples; Fibrose; Método não-invasivos;

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver disease, whose morbidity has rapidly increased worldwide. The NAFLD includes a spectrum of histopathological characteristics ranging from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which is characterized by inflammatory hepatocellular lesions and variable degrees of fibrosis that can progress to cirrhosis. Fibrosis is the most important prognostic factor in assessing the progression of liver disease. Early diagnosis is very important in order to prevent the development of cirrhosis and its complications. Liver biopsy is the gold standard for the diagnosis and differentiation of steatosis, NASH and staging of liver fibrosis. However, it is an invasive procedure with some limitations

and risks. Non-imaging methods, clinical features and biochemical tests as well as imaging methods are some alternative methods of non-invasive tests. A better understanding of the pathophysiology of NASH and technological advances have allowed the development of new methods that may be an alternative to liver biopsy in the future. This review aims to analyze the benefits and progress of non-invasive methods in the diagnosis and prognostic evaluation of NASH.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Nonalcoholic steatohepatitis; Fibrosis; Noninvasive methods;

Introdução

O Fígado Gordo Não Alcoólico (FGNA) é a principal causa de doença hepática crónica nos países ocidentais, com uma prevalência estimada de 20 a 30%, sendo em Portugal cerca de 30%. [1] Estudos epidemiológicos têm verificado um aumento da sua prevalência em todo o mundo, uma vez que está fortemente associada à obesidade e à síndrome metabólica, sendo a terceira causa de transplante hepático nos Estados Unidos. [2] Dentro de cinco anos, prevê-se que nos Estados Unidos a principal causa de transplante hepático seja por cirrose consequente do FGNA, ultrapassando assim as hepatites virais. [3] Além disso, os doentes com FGNA tem um risco aumentado de doença cardiovascular e o risco de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) duplica, independentemente da gravidade da lesão hepática. [4]

A maioria dos indivíduos com FGNA apresentam Esteatose Simples (ES), que se caracteriza por uma acumulação de gordura no fígado e por ser uma situação benigna não evolutiva, tem uma sobrevida semelhante ao da população em geral. [5] No entanto cerca de um quinto destes doentes, além de esteatose, apresenta também atividade necro-inflamatória, passando esta condição a designar-se por esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), que é uma condição gradualmente progressiva e que se associa a graus variáveis de fibrose hepática, podendo assim evoluir para cirrose hepática ou mesmo carcinoma hepatocelular. [6] Os doentes com EHNA apresentam um risco cinco vezes superior de mortalidade por causa hepática comparativamente com os que têm ES, sendo a fibrose o fator de prognóstico mais importante no FGNA. [7] Segundo vários estudos epidemiológicos, a EHNA apresenta uma prevalência de cerca de 3 a 5% a nível global. [8]

Tendo em conta as possíveis complicações do FGNA, o facto de ser uma condição clínica prevalente e assintomática e de se prever que a incidência de cirrose nos doentes com EHNA continue a aumentar no futuro próximo, devido ao crescente aumento de obesidade, é necessário conseguir diagnosticar precocemente a EHNA, com o intuito de prevenir o desenvolvimento de cirrose e as suas complicações. [9]

Atualmente a biópsia hepática é o gold-standard para o diagnóstico das diferentes formas da doença, permitindo fazer o estadiamento da doença e contribuir na avaliação do prognóstico através da graduação da fibrose hepática. [10]

No entanto é um procedimento invasivo e dispendioso que para além de exigir conhecimentos técnicos específicos, apresenta alguma variabilidade intra e inter-

observador. [11] Em 1-3% dos casos, tem um risco de complicações que embora raras, são potencialmente fatais em 0,01% dos casos. [12] Para além disto, apenas avalia uma pequena amostra de todo o fígado, o que pode levar a excluir erradamente o diagnóstico quando as lesões não se distribuem uniformemente. [13] Contudo, as características histológicas da EHNA distribuem-se de forma relativamente regular na zona 3 de cada lóbulo do fígado, o que poderá parcialmente diminuir o risco de erro da amostra. [14] Para além das limitações mencionadas, a elevada prevalência de FGNA torna impraticável a realização de biópsia hepática a todos os doentes, devendo assim ser reservada para doentes selecionados. Não existe consenso sobre a realização deste procedimento, contudo considera-se que a decisão de realizar uma biópsia para o diagnóstico deve basear-se nos resultados da Elastografia Transitória e da avaliação dos fatores de risco dos doentes, devendo-se realizar a biópsia quando os resultados são divergentes. [14]

De acordo com os achados na biópsia, considera-se ES quando há infiltração lipídica em mais de 5% dos hepatócitos. [15] Já o diagnóstico de EHNA assenta na presença de lesão celular sob a forma de hepatócitos balonizados (com ou sem corpos de Mallory-Denk) e infiltrado inflamatório lobular, podendo ter graus variáveis de fibrose. [16] Os hepatócitos balonizados encontram-se envolvidos por fibras de colagénio perisinusoidal e reagem menos aos anticorpos anti-citoqueratina 8 e 18 do que os hepatócitos normais. [14] Desta forma a imunohistoquímica pode ser usada para identificar os hepatócitos balonizados, mas não é usada na prática clínica. Em relação aos corpos de Mallory-Denk, de acordo com Bedossa, estes podem ser numerosos em doentes com EHNA grave sendo, por vezes, apenas detetados por imunohistoquímica ao analisar o p62 e a ubiquitina. [14] A inflamação lobular é outra característica da EHNA, caracterizada por pequenos agrupamentos de linfócitos, células de Kupffer, microgranulomas com ou sem vacúolos lipídicos. [14] A detecção de células inflamatórias, tais como macrófagos ou linfócitos, pode ser utilizada para determinar o fenótipo da EHNA. [14]

No entanto, a mais importante característica histológica da EHNA é a fibrose. Alguns dos doentes com EHNA vão desenvolver fibrose avançada apresentando um elevado risco de morbilidade e mortalidade, em comparação com os doentes com fibrose ligeira a moderada. [17] O grau de fibrose relaciona-se com as mortalidades global e hepática elevadas, de forma independente dos outros fatores histológicos. [18] Segundo a classificação de Brunt', considera-se F0 a ausência de fibrose e F4 a presença de cirrose,

sendo F2-F4 fibrose clinicamente significativa e F3-F4 fibrose avançada. Na presença de fibrose avançada (F3-F4) a mortalidade é 10 vezes superior à da população em geral. [12] Assim a classificação dos doentes por estadios na EHNA tem elevada importância para o prognóstico, permitindo uma melhor monitorização dos grupos de risco. [12]

As amostras das biópsias são classificadas segundo o *NASH activity score* (NAS), que pretende refletir a atividade da doença. Este sistema de classificação varia entre 0 e 8, de acordo com o grau de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-2) e hepatócitos balonizados (0-3). [14] Desta forma há uma forte correlação entre o aumento do NAS e a presença de EHNA, onde valores iguais ou superiores a cinco confirmam o diagnóstico de EHNA, e valores inferiores a três excluem-no. No entanto, o NAS não fornece informações de prognóstico a longo prazo. [14]

Todas estas limitações conduziram, nos últimos anos, ao grande investimento no desenvolvimento de métodos não invasivos para diagnosticar EHNA e estimar quantitativamente a fibrose hepática de modo a determinar o prognóstico. [4]. O exame não invasivo ideal deveria distinguir os indivíduos que têm EHNA daqueles que têm ES e ainda avaliar a gravidade da fibrose hepática através da sua quantificação nos doentes que já têm EHNA. [19] Deve-se ter em consideração que um bom teste de rastreio deve ter uma alta sensibilidade, enquanto um exame de diagnóstico, que seleciona os doentes para outros procedimentos invasivos, tratamentos ou ensaios clínicos deve ter alta especificidade. [4] O desenvolvimento de métodos não invasivos rápidos e eficazes é fundamental para permitir a qualquer médico de clínica geral identificar precocemente os doentes com EHNA. [20]

Métodos não invasivos

1. Métodos não imagiológicos

Foram desenvolvidos vários métodos, que podem ser divididos em marcadores diretos, estando estes relacionados com a fisiopatologia, como por exemplo os marcadores de inflamação, de apoptose, de stress oxidativo e de fibrose; e marcadores indiretos, parâmetros de avaliação analítica tais como, a albumina, a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), a gama glutamil transferase (GGT), tempo de protrombina (TP), a bilirrubina e a contagem de plaquetas. No entanto os testes serológicos fornecem apenas algumas informações que podem indiciar as alterações histológicas do FGNA.

1.1 Métodos bioquímicos

1.1.1 Função Hepática

Os marcadores da função hepática como a albumina e o TP, estão alterados na presença de cirrose, podendo os níveis de bilirrubina também estar aumentados. Embora estes marcadores ajudem na avaliação da gravidade da descompensação hepática não são sensíveis para avaliar as fases de fibrose no caso de EHNA, na ausência de cirrose. [21] Do ponto de vista analítico, as provas de função hepática não são métodos confiáveis para confirmar o diagnóstico de FGNA nem de EHNA. [22]

1.1.2 Relação AST/ALT

Os doentes com aminotransferases elevadas têm uma probabilidade aumentada de desenvolver EHNA, mas a EHNA não pode ser excluída em doentes com valores normais. [4] Por outro lado, os níveis das aminotransferases não são úteis para a identificação da fibrose, uma vez que podem diminuir com o aumento da esteatose e da inflamação, e da progressão da fibrose. [23] A razão AST/ALT é mais útil uma vez que os doentes com doença hepática crónica apresentam uma relação entre a AST/ALT elevada, resultando da alteração da clearance da AST pelas células sinusoidais lesadas. [24] Em doentes sem fibrose grave a relação AST/ALT é inferior a um, mas tem tendência a aumentar com a

progressão da fibrose. Consequentemente vários estudos referem uma forte associação da relação da AST/ALT superior a um com fibrose avançada, no caso de EHNA. [15]

1.1.3 AST/Plaquetas (Índice de APRI)

Outro marcador utilizado é a relação AST/Plaquetas (índice de APRI). Embora inicialmente tenha sido proposto para doentes com hepatite C crónica, este índice tem sido utilizado nos doentes com FGNA, essencialmente para avaliação da fibrose. Esta relação apresenta um valor preditivo negativo (VPN) de 93% e valor preditivo positivo (VPP) de 54% para estadios de fibrose avançada. [25] Assim, a APRI ajuda a identificar doentes que são suscetíveis de ter fibrose avançada (F3-F4). [18] A hepatite aguda pode produzir falsos resultados positivos no APRI, resultante do aumento dos níveis séricos de aminotransferases na fórmula. [15]

1.2 Marcadores relacionados com a fisiopatologia

1.2.1 Marcadores de apoptose

O aumento da apoptose de hepatócitos no fígado contribui para a progressão da doença para EHNA e desenvolvimento de fibrose. A apoptose ocorre através de duas vias: a extrínseca mediada por recetores como o FAS e a intrínseca mediada pela lesão mitocondrial.

Citoqueratina 18 (CK 18)

Para a identificação dos doentes com EHNA o doseamento dos níveis séricos dos fragmentos de citoqueratina 18, através da identificação destes com recurso a anticorpos monoclonais M30 ou M65, parece bastante promissor. [20] Os fragmentos de citoqueratina-18 no plasma resultam da desintegração da CK-18 (uma proteína do filamento intermediário do fígado) pela caspase-3, após a apoptose dos hepatócitos. [18]

Os níveis séricos dos fragmentos de CK-18 superiores a 250 U/l tem 78% de sensibilidade e 82% de especificidade para EHNA, pelo que por si só tem alguma limitação do diagnóstico de doentes com EHNA. [26]. Existem ainda estudos que sugerem a combinação deste biomarcador com outros para o diagnóstico com maior segurança. Assim os valores de citoqueratina 18 foram combinados com factores de risco metabólicos e outros biomarcadores de FGNA, como *scores* de fibrose, adiponectina e resistina, com o intuito de diagnosticar EHNA. No entanto estes algoritmos não foram validados, carecendo de mais investigação. [14]

Apesar dos resultados moderadamente promissores, não é frequentemente utilizado, não estando ainda disponível na maioria dos centros, provavelmente pelo preço e pela apenas moderada sensibilidade e especificidade. [22]

FAS ligando

Outro marcador de apoptose que tem sido validado para o diagnóstico de EHNA é o FAS ligando, uma proteína transmembranar dos hepatócitos que está aumentada em doentes com EHNA. [18] No entanto, os dados disponíveis são limitados e exigem mais investigação antes de serem integrados na prática clínica.

1.2.2 Marcadores inflamatórios

Uma vez que a EHNA se caracteriza por ser um estado pró-inflamatório, em que há produção de citocinas pró-inflamatórias, alguns estudos referem o uso destas como marcadores de inflamação para a identificação de doentes com EHNA, como por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 6 (IL-6), que podem estar aumentados na EHNA. [20] Existem algumas divergências entre estudos pelo que o seu valor de diagnóstico ainda não foi esclarecido. [27]

Muitas outras citocinas (IL-1B e proteínas inflamatórias de macrófagos) e adipocinas (resistina, visfatina, retinol e proteína-4) têm sido estudadas como potenciais biomarcadores. [18] O tecido adiposo contém adipocinas importantes no estado inflamatório e que conduzem à progressão da doença hepática. Alguns estudos revelaram também o aumento da proteína dos monócitos (MCP-1), também chamada de quimiocina CC-ligando 2 (CCL2), uma citocina inflamatória, em doentes com EHNA quando comparados com doentes com ES. [15] Verifica-se ainda que a razão entre neutrófilos e linfócitos é maior em doentes com EHNA. [18]

Verificou-se também que o fator de crescimento dos fibroblastos 21 (FGF 21), que está envolvido na regulação do metabolismo da glicose e dos lípidos, se encontra elevado em doentes com esteatose, podendo ser utilizado para determinar o seu grau. [28] Embora o FGF 21 seja menos preciso para o diagnóstico de ES e EHNA do que a CK-18, a combinação destes dois marcadores aumenta a sensibilidade para o diagnóstico de EHNA, apresentando um VPN e VPP de 80%. [7]

A pentraxina-3 também tem sido estudada para o rastreio de EHNA, apresentando para valores superiores a 1,61 ng/ml uma sensibilidade de 67% e especificidade de 70%. [4]

Um estudo recente demonstrou que os níveis séricos elevados do fragmento M30 da citoqueratina 18 (CK-18-M30), do fator de crescimento dos fibroblastos 21 (FGF-21), do antagonista do recetor interleucina 1 (IL-1Ra), do fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) e da osteoprotegerina (OPG) estão fortemente associado com a progressão de EHNA, sendo que a combinação destes marcadores poderá permitir a identificação de EHNA. [27]

Ferritina

Os doentes com FGNA apresentam níveis séricos de ferritina elevados, que parecem estar relacionados com a resistência à insulina e a inflamação do fígado e não com a sobrecarga de ferro. [18] Vários estudos consideram que a ferritina é um fator de risco em doentes com FGNA, independentemente da existência de fibrose avançada. [29] No entanto a ferritina pode estar elevada devido a outras doenças crónicas e estados inflamatórios, pelo que não é suficientemente específica para ser utilizada na prática clínica com o intuito de diagnosticar EHNA e fibrose avançada. [30]

1.2.3 Marcadores oxidativos

O stress oxidativo é também importante na lesão hepatocelular e na progressão da doença para EHNA. Várias vias de oxidação contribuem para a peroxidação lipídica nos doentes com EHNA incluindo vias enzimáticas e não enzimáticas das quais resultam produtos que podem ser quantificados.

Estudos demonstraram um aumento dos níveis séricos dos produtos da oxidação do ácido hialurónico (9 e 13 HODEs) nos doentes com EHNA. [20] Com base nestes resultados desenvolveu-se o algoritmo oxNASH, que é calculado a partir da razão 13 HODEs/ácido hialurónico, da idade, índice de massa corporal (IMC) e da AST. [19] Os doentes com valores superiores a 72 apresentam uma probabilidade 10 superior de ter EHNA em comparação com aqueles cujo valor de oxNASH é inferior a 47. [18] Este indicador permite determinar com precisão o prognóstico e o estadiamento de fibrose, no entanto mais estudos serão necessários para a sua validação. [18]

Existem outros marcadores de stress oxidativo que têm também mostrado resultados promissores. A concentração sérica de 8-isoprostano-F2a é elevada em doentes com EHNA quando comparados com a dos doentes com ES, encontrando-se, no entanto, numa fase precoce de estudo. [22] Outros marcadores de stress oxidativo como o peróxido

de glutathione superóxido, o superóxido dismutase e a lipoproteína de baixa densidade têm também demonstrado utilidade para distinguir ES de EHNA. [20]

1.2.4 Marcadores de fibrose

Têm também sido utilizados biomarcadores de síntese e degradação da matriz para avaliação da gravidade da fibrose hepática, uma vez que a fibrose hepática é um processo dinâmico, envolvendo interações entre as enzimas extracelulares de síntese e de degradação da matriz. Os componentes da matriz extracelular como o ácido hialurónico, o colagénio (colagénio tipo IV, péptido pro-colagénio tipo III e P3NP) e a laminina foram examinados isoladamente e em combinação como potenciais métodos para avaliação da fibrose em doentes EHNA. [15] No entanto nenhum ganhou popularidade.

Vários estudos verificam que os valores de *ácido hialurónico* conseguem prever a ocorrência de pontes de fibrose e cirrose em doentes com FGNA. [31] Contudo é menos preciso em detetar estadios iniciais da doença. Este encontra-se aumentado nas doenças inflamatórias sistémicas, o que pode determinar a existência de resultados falsos positivos. [31]

O *colagénio tipo IV*, resultante da degradação de colagénio, é um indicador de fibrinólise. [31] Níveis séricos deste marcador estão aumentados na presença de fibrose severa em doentes com FGNA, sendo que para valores de cut-off de 5,0 ng/ml os valores preditivos positivos e negativos são respetivamente, 68% e 84%. [31]

A *Laminina* é um componente da matriz extracelular que é eliminada pelas células hepáticas endoteliais. Um pequeno estudo de 30 doentes com FGNA revelou que níveis superiores a 282 ng/ml detetam a presença de qualquer grau de fibrose. [31]

O *Serum YKL-40* é uma glicoproteína secretada por diferentes tipos de células, incluindo as células estreladas. Elevados níveis de serum YKL-40 têm sido associados a doentes com FGNA, no entanto são necessários mais estudos. [31]

O *Procolagéneo III (PIIINP)* é um péptido resultante da clivagem do colagénio, sendo considerado um marcador da reparação tecidual e de fibrose. Alguns estudos têm demonstrado que o PIIINP permite identificar com precisão a ES, EHNA e fibrose avançada. [31] No entanto a capacidade deste marcador para discriminar os diferentes graus de fibrose não é eficaz. Desta forma, mais estudos são necessários antes da sua aplicação clínica. [31]

1.2.5 Lipotoxicidade

Considera-se também que a lipotoxicidade é um mecanismo subjacente à progressão da ES, EHNA e desenvolvimento da fibrose. Estudos recentes têm demonstrado que os eicosanóides do plasma, como os metabolitos de ácidos gordos polinsaturados podem ajudar a distinguir ES de EHNA. O 11,12-di-hidroxi-ácido eicosatrienóico (11,12 diHETrE) foi identificado como sendo o mais específico para diferenciar estas duas entidades. [14]. Existem ainda outros produtos como o 20-carboxi ácido araquidónico (20-COOH AA) e 13,14-di-hidro-15-ceto prostaglandina D2 (dkPGD2) que já foram identificados [14]. Embora estes marcadores sejam extremamente promissores, requerem mais investigação e validação.

1.3 Scores - Combinação de variáveis

Atualmente sabe-se que a fibrogénese é um processo dinâmico, com possibilidades de progressão e regressão. Os testes bioquímicos e serológicos avaliados isoladamente têm pouco valor para a aferição do desenvolvimento de fibrose. [15] Por outro lado, os parâmetros clínicos são cada vez mais relevantes, sendo que a presença de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade e idade avançada estão associados a maior risco de desenvolvimento de EHNA e maior grau de fibrose. [32]

Desta forma, os fatores de risco têm sido combinados com resultados bioquímicos e serológicos originando scores integrados, com o intuito de aumentar o valor preditivo negativo, possibilitando a identificação de doentes com baixo risco para quem a biopsia hepática com o intuito de estadiamento e determinação do prognóstico pode ser evitada. [28] Assim é possível prever melhor a gravidade e a presença de fibrose no FGNA, auxiliando ainda na decisão de realizar biópsia hepática para estadiamento. [33]

Por outro lado, é necessário estar atento à clínica, embora a maioria sejam assintomáticos ou tenham sintomas clínicos não característicos de doença hepática, podem, por vezes, manifestar fadiga, dor no hipocôndrio direito e hepatomegália. [18] Raramente os doentes apresentam manifestações de doença hepática avançada. Estas manifestações podem ajudar na avaliação da gravidade da doença em doentes com doença hepática. A lipohipertrofia dorso-cervical é o critério antropométrico mais fortemente relacionado com a EHNA e com a gravidade da lesão hepática. [4]

Scores para avaliação da Esteatose:

- 1.3.1 SteatoTest (ST) foi desenvolvido para ser um marcador não invasivo para esteatose. Este índice combina os cinco componentes bioquímicos de FibroTest® com ALT, IMC, colesterol, triglicéridos e glicose (ajustado para idade e sexo), tendo sido avaliado para hepatite crónica C e B, doença hepática alcoólica e esteatose hepática. [34] O ST permite prever um grau de esteatose 2-4 com uma sensibilidade e especificidade de 90% e 70% e com valor preditivo negativo e positivo, respetivamente, 93% e 63%. [15]
- 1.3.2 Fatty Liver Index (FLI) um algoritmo que inclui as seguintes variáveis: IMC, perímetro abdominal, triglicéridos e GGT. Este tem mostrado uma boa precisão na deteção de FGNA, sendo apenas utilizado em estudos epidemiológicos. O FLI apresenta um valor preditivo negativo de 94% para excluir EHNA. [27] Contudo é um índice que está longe de ser ideal, pelo que os seus resultados devem ser interpretados com cuidado. [4]
- 1.3.3 NAFLD Liver Fat Score inclui as seguintes variáveis: presença de síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2, a insulina em jejum, AST e ALT. Este índice apresenta uma sensibilidade e especificidade de 95%. [23] Este índice pode ser facilmente usado para o diagnóstico sem recorrer à imagiologia. [4]

Existem outros índices como o Lipid Accumulation Product (LAP) e a Ultrasonographic Fatty Liver Indicator (US-FLI) que requerem mais investigação e validação. [4]

Scores para avaliação da EHNA:

Existem vários algoritmos que foram desenvolvidos para avaliação da EHNA. No entanto a maioria não foram validados externamente, uma vez que foram obtidos a partir de populações com características específicas, nomeadamente a partir de doentes com FGNA e obesidade mórbida, sendo pouco fiável a extrapolação para os doentes apenas com FGNA. [23] Alguns desses algoritmos são HAIR, Palekar et al; NASH Diagnostic e Nice model. [4]

O NASH Test, que é um algoritmo que inclui a combinação de 13 variáveis clínicas e bioquímicas, como a idade, sexo, peso, altura, níveis séricos de colesterol, triglicéridos, α 2-microglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, GGT, ALT, AST e a bilirrubina, apresenta uma sensibilidade de 33% e especificidade de 94%. [18] Alguns autores aconselham que NASHTest deve apenas ser realizado quando o Steatotest for positivo. [4]

Sumariamente, o melhor marcador validado para avaliação da EHNA é a determinação dos níveis séricos dos fragmentos de CK18. Vários scores, que incluem os fragmentos de CK18, têm sido desenvolvidos, mas carência de validação externa. [4]

Recentemente foi verificado que os níveis de HDL-C se encontravam elevados em doentes com EHNA em comparação com os doentes com ES. Desta forma no futuro, os níveis de HDL-C poderão ser adicionados a algoritmos existentes de EHNA, para estimar o risco destes doentes. [35]

Scores para avaliação da Fibrose:

- 1.3.4 NAFLD fibrosis score (NFS) engloba seis variáveis utilizadas na prática clínica (idade, IMC, glicémia, contagem plaquetar, níveis de albumina e razão AST/ALT). [22] Com este índice um score inferior a -1,455 exclui fibrose avançada e um score superior a 0,676 está associado a fibrose avançada. [36] Baixos scores excluem fibrose avançada e elevados scores tem elevada precisão para o diagnóstico (90%). Não apresenta significado clínico na identificação de fibrose moderada. [22] Outra vantagem deste score é o facto de permitir prever o prognóstico, identificando os doentes com FGNA que têm risco aumentado de desenvolver complicações hepáticas. [36] Uma das principais limitações é que 20-58% dos indivíduos ficam entre esses dois valores e, como tal, são inclassificáveis. [36] Os dados apontam para uma pior acuidade em doentes com obesidade mórbida. [15] Tanto a American Association for the Study of liver disease como a European Association for the study of the liver guidelines têm recomendado o uso na prática clínica do score NAFLD para determinar os doentes que necessitam de realizar biópsia hepática para estadiamento. [15]
- 1.3.5 FibroTest (FT) é um índice que inclui α 2-macroglobulina (A2M), apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina total e GGT. [37] O FibroTest foi inicialmente desenvolvido para as hepatites virais, contudo foi proposto a sua utilização no FGNA, apresentando uma boa sensibilidade para o diagnosticar fibrose significativa. [37] No entanto, este score não permite distinguir entre graus de fibrose significativa de moderada, um terço dos doentes avaliados apresentam valores intermédios, sendo nestes casos impossível prever o grau de fibrose. [23] Em relação aos resultados: score <0.3 tem 98% valor preditivo negativo para o diagnóstico de fibrose ou cirrose, score > 0,7 apresenta valor preditivo positivo de 60% para diagnóstico

de fibrose ou cirrose. [37] A existência de hemólise ou síndrome de Gilbert, pode conduzir a falsos positivos (por um haptoglobina diminuída e aumento da bilirrubina). [22]

- 1.3.6 FibroMeter NAFLD inclui 7 variáveis: Glicose, AST, ferritina, AST, plaquetas, peso e idade. [38] Os resultados para avaliação de fibrose em estadio avançado foram semelhantes aos resultados no *NAFLD fibrosis score*, mas melhores aos obtidos pelo APRI. [38] Este método também demonstrou ser semelhante ao *NAFLD fibrosis score* na identificação de cirrose, mas melhor do que este para identificação de fibrose significativa. [20] FibroTest e o FibroMeter são dois métodos que apresentam bons valores preditivos negativos para a presença de fibrose em ponte ou cirrose em doentes com FGNA. [15]
- 1.3.7 BARD score inclui 3 variáveis: o IMC ($\text{IMC} \geq 28 = 1$ ponto), a presença ou ausência de diabetes mellitus tipo 2 (1 ponto) e a relação AST/ALT ($\text{AST/ALT} \geq 0,8 = 2$ pontos). Resultados entre 2-4 está associado a uma probabilidade de 17,3 vezes superior de ter fibrose avançada. [39] No entanto como apresentava um valor preditivo positivo de 42%, foi sugerido um novo índice, o BARDI, que acrescenta o valor da razão normalizada internacional (INR). [18] Comparado com o BARD, o BARDI apresenta um valor preditivo positivo 51% e manteve o valor preditivo negativo, 100%. [18]
- 1.3.8 FIB-4, foi inicialmente desenvolvido para avaliação da fibrose avançada (F3-F4) em doentes com co-infecção de HCV e HIV, tendo sido posteriormente proposto para doentes com FGNA. Este inclui contagem de plaquetas, idade, AST e ALT. Neste caso valores $\geq 2,67$ e $<1,30$ tem sido razoavelmente seguros para identificar e excluir, respetivamente, doentes com fibrose avançada. [15] Este índice demonstrou superioridade em relação ao ELF, AAR, índice AP, APRI, BARD e *NAFLD fibrose score*. [40] Apenas o NFS e o FIB-4 foram validados externamente mais do que uma vez, em diferentes populações de FGNA e com resultados consistentes. [41]
- 1.3.9 Hepascore inclui 6 variáveis: bilirrubina, Gama-GT, AH, alfa-2-microglobulina, idade e género. Este índice permite a avaliação dos estadios F3 e F4 sendo mais apropriada e mais precisa do que BARD e APRI, mas semelhante ao FIB-4 score e FibroTest. O Hepascore parece ser mais preciso

na previsão de doença em estadio cirrótico do que os outros quatro scores. [40]

- 1.3.10 Enhanced Liver Fibrosis (ELF) foi desenvolvido com base no conceito que o desenvolvimento de fibrose hepática é um processo dinâmico, pelo que há aumento dos níveis séricos resultantes dos produtos da matriz extra-celular e da sua remodelação. [18] O ELF inclui três biomarcadores: ácido hialurónico, o inibidor de tecido da metaloproteinase 1 (TIMP-1) e o péptido amino-terminal do pró-colagénio III (PIIINP). [18] Este algoritmo apresenta um excelente desempenho para prever fibrose moderada (F2-F4) e avançada (F3-F4), com uma sensibilidade de 80% e especificidade de 90%, apresentando resultados promissores nos doentes com FGNA. [42]

Além destes, muitos outros algoritmos foram propostos para determinar a progressão da fibrose como é o caso BAAT, Gholam's model, Original European Liver Fibrosis score (OELF), NAFIC score e o NAFLD Diagnostic Panel, no entanto requerem mais estudos para a sua validação. [16]

2. Métodos Imagiológicos

A ultrassonografia abdominal é o método de imagem não invasivo, utilizado por rotina, em doentes com suspeita de esteatose hepática. [18] Nestes casos há um aumento da ecogenicidade, resultante do aumento da interface pela acumulação intracelular de vesículas lipídicas, aparecendo assim o fígado mais brilhante do que o córtex renal e o baço. [15] Outra característica é a atenuação dos ultrassons em comparação com o diafragma, existindo uma perda de definição do diafragma. [15] A sensibilidade de diagnóstico é de 60%-94% de acordo com o grau de esteatose, e a especificidade varia entre 84% - 95%. [22] No entanto, esta técnica para além de ser operador-dependente, está sujeita a uma variabilidade significativa, não permitindo o diagnóstico de EHNA e fibrose hepática com precisão. [28] Por outro lado, quando o grau de esteatose é inferior a 30%, é difícil detetar a esteatose tanto com este método como com a tomografia computadorizada (TC). [43] Nestes casos a espectroscopia por ressonância magnética (RMS) é o método com maior acuidade o diagnóstico. [22] Recentemente, foi também desenvolvido um método para deteção e quantificação da esteatose hepática denominado coeficiente de atenuação controlada (CAP), através do qual é possível detetar níveis bastante baixos de esteatose. [44]

Por outro lado, durante a última década, os avanços nos métodos de imagem têm sido grandes, havendo uma grande aposta também em métodos com capacidade de quantificar a fibrose através da rigidez do fígado, com recurso à elastografia. [11] O primeiro método a utilizar esta tecnologia foi o Elastografia Transitória (FibroScan®), no entanto outras técnicas de avaliação da elasticidade hepática parecem ser muito promissoras, existindo atualmente várias, como a técnica de radiação acústica (ARFI), a elastografia por ressonância magnética (RME) e a elastografia em tempo real. [14] A que tem sido mais estudada no contexto do FGNA é o FibroScan®, apesar de o ARFI ter a vantagem de ser acoplado ao aparelho de ecografia, podendo os resultados desta e da elasticidade ser obtidos num único exame. [17]

A ultrassonografia com Doppler permite a avaliação da vasculatura das artérias hepáticas, através do cálculo do índice de resistência da artéria hepática (HAIR), e desta forma determinar a existência de fibrose significativa (F2-F4) no fígado. [45] Um resultado de HAIR superior a 0,75, têm uma sensibilidade de 78% e especificidade de

75% para fibrose significativa, podendo ser utilizado como um método alternativo em doentes que não são bons candidatos ao Fibroscan®. [45]

2.1 Elastografia Transitória (TE) – FibroScan®

O Fibroscan® (Echosens, FSC) é uma técnica não invasiva que usa os ultrassons com o objetivo de avaliar a fibrose hepática através da quantificação da rigidez do fígado, utilizando uma sonda própria com um tamanho padronizado para o efeito, designada sonda M. [10]

Esta técnica tem as vantagens de ser indolor, reprodutível, não depender do operador e ser possível de realizar à cabeceira do doente e em ambulatório. [46] É um exame muito bem aceite pelos doentes, mesmo naqueles que recusam a biópsia, não necessitando de internamento. [10] O tempo necessário para a sua execução é cerca de 5 minutos e o resultado é imediato e fiável, após a realização de 10 medições. [10] Os resultados são apresentados numa variável numérica expressa em KPa, cujos valores normais são inferiores a 5 kPa, sendo mais elevados em homens e em doentes com IMC elevado. [22]

O Fibroscan® deve ser realizado por um operador com experiência (>100 exames) seguindo um protocolo padronizado com o doente em jejum, de pelo menos 2 horas, em decúbito dorsal, com o braço direito em abdução completa, avaliando no 9º ao 11º espaço intercostal. [47]

Contudo a interpretação dos resultados exige alguns cuidados para validação dos mesmos, devendo-se ter em consideração os seguintes aspetos: IQR (intervalo interquartil médio) /valor médio (<30%); níveis de aminotransferases (<5×LSN); IMC > 30 kg /m² (ou se a distensão capsular for > 25mm) – usar sonda XL; ausência de colestase extra-hepática; ausência de insuficiência cardíaca direita ou outras causas de estase hepática; ausência de ingestão contínua excessiva de álcool. [48]

Para além dos doentes obesos, os resultados do Fibroscan® também podem ser difíceis de obter em doentes com espaço intercostal estreito e são quase impossíveis de obter em doentes com ascite. [48] Como o fígado se encontra envolvido pela cápsula de Glisson, lesões que ocupam esse espaço como edema, inflamação, colestase extra-hepática e congestão podem interferir com os valores obtidos, havendo uma superestimação da rigidez hepática. [19]

O maior desafio na utilização desta técnica na prática clínica, em doentes com FGNA, é a incapacidade de obter qualquer medição em 3,1% dos casos e o facto de apresentar resultados inclassificáveis (que não cumprem as recomendações do fabricante) em 15,8%, principalmente devido à obesidade do doente ou a experiência limitada do observador. [19] Além disso, um estudo recente relatou uma discrepância significativa em até 20% dos casos em pacientes sem cirrose entre os diferentes dispositivos Fibroscan®. [19]

Para superar algumas destas limitações foi criada uma sonda XL para pessoas com obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$), permitindo reduzir a taxa de insucesso. [47] Verificou-se que as falhas na medição eram significativamente menos frequentes com a sonda XL do que com a sonda M, no entanto, os resultados inclassificáveis ainda foram observados com a sonda XL. [49] A taxa de insucesso da sonda XL é menor do que a obtida pela sonda M, 2% e 10% respetivamente. Os valores de rigidez obtidos com sonda XL são mais baixos do que o obtido com a sonda M. [47]

Este método foi inicialmente validado para a determinação da fibrose na hepatite C crónica, mas tem sido recentemente estudado para outras entidades como o FGNA. [19] Este método parece ter interesse para excluir fibrose avançada (F3-F4) e cirrose, uma vez que apresenta VPN elevados de 90% e VPP de 74%. [13] Valores superiores a 10,5 kPa correspondem a estádios de fibrose avançada ou mesmo cirrose. O Fibroscan® tem excelente correlação com os vários estádios de fibrose. [22]

O FibroScan® apresenta um melhor desempenho no diagnóstico de cirrose (classificando corretamente 80% a 98% dos casos) do que de fibrose significativa (F2-F4) (classificando corretamente 57 % a 90% dos casos). [50]

Os valores usados para definir os estádios de fibrose são diferentes de acordo com a sonda utilizada. Os valores estabelecidos para diagnóstico dos diferentes estádios para a sonda XL e Sonda M são, respetivamente: F2: 6,2 vs 7,0 kPa; F3: 7,2 vs 8,7 kPa; F4: 7,9 vs 10,3 kPa. [19]

Embora a taxa de resultados pouco fiáveis continue a ser o principal desafio desta técnica, a utilização do Fibroscan® apresenta interesse para excluir fibrose avançada e cirrose. Para além disso pela sua acessibilidade e reduzido custo é uma técnica facilmente implementada e aceite na prática clínica. [19]

No entanto, o Fibroscan® tem algumas limitações nomeadamente para avaliação da progressão do FGNA. [14]

2.2 Técnica de radiação acústica (ARFI)

Outras técnicas de imagem baseadas na elasticidade do fígado têm sido estudadas no contexto do FGNA. Nos últimos anos resultados semelhantes à elastografia para a avaliação da fibrose hepática tendo sido obtidos utilizando a tecnologia Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI). [21]

A tecnologia ARFI parece ter boa correlação com o estadió de fibrose. Foi realizado um estudo que concluiu que a elastografia ARFI apresenta boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de fibrose significativa (F2-F4) e de fibrose avançada (F3-F4), com resultados semelhantes ao Fibroscan® quando comparados com a biópsia hepática. [20] Apresenta uma sensibilidade de 80,2% e especificidade de 85,2% para deteção de fibrose significativa. [18] Uma vantagem deste método é que pode estar acoplada ao equipamento convencional de ultrassonografia, sendo que a avaliação ultrassonográfica pode ser feita simultaneamente com a da ARFI, o que não é possível com o Fibroscan®. [51] Por outro lado, a ARFI permite focar regiões específicas do fígado para medir as várias profundidades em áreas distintas. [20]

O $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$ não é um fator limitante para o uso desta técnica, as viabilidades dos resultados em doentes obesos são melhores usando a ARFI do que a sonda M e semelhantes quando se usa a sonda XL. [19]

2.2.1 pSWE /ARFI

Outra técnica utilizada é a elastografia por onda de cisalhamento (SWE) utilizando impulsos acústicos como a ARFI. Apresenta maior validação na hepatite C crónica do que para a hepatite B crónica, e ainda na co-infecção HIV-HCV, na esteatose hepática e noutras doenças do fígado. [19] Poucos estudos têm avaliado este método nos doentes com FGNA. [19]

A pSWE / ARFI apresenta um melhor desempenho para a deteção de cirrose do que para a fibrose significativa (F2-F4). [52] A pSWE / ARFI apresenta um desempenho semelhante ao Fibroscan® para a deteção de fibrose e cirrose (sensibilidades sumárias e especificidades para o diagnóstico de fibrose significativa foram 74% e 83% para ARFI e 78% e 84% para o Fibroscan®, respetivamente, e 87% e 87% para ARFI e 89% e 87% para o Fibroscan®, para o diagnóstico de cirrose, respetivamente). [53]

Curiosamente 80% dos doentes com IMC entre 30 e 40 Kg/m^2 e 58% dos doentes com $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$ podem ser avaliados com sucesso pelo pSWE/ARFI. [53] A taxa

de insucesso é significativamente menor do que a de Fibroscan® (2,9% vs 6,4%), especialmente em doentes com ascite ou obesidade. [52] Tem também boa reprodutibilidade nos doentes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), variando entre 0,84-0,87. [19] Tem ainda a vantagem de poder ser implementado em máquinas de ultrassom comerciais. [52]

No entanto os resultados são influenciados pela ingestão de alimentos, bem como os níveis de atividade necro-inflamatória e os valores das transaminases, os quais levam a uma sobrestimação da fibrose hepática, o que é importante aquando da interpretação dos resultados. [52] Actualmente, para a interpretação correta do pSWE /ARFI na prática clínica e validação dos dados é necessário assegurar: jejum de pelo menos 2 horas; níveis de transaminases inferiores a 5x normal; e ausência de colestase extra-hepática. [19]

No entanto ainda estão por estabelecer os valores de cut-off para avaliar os diferentes estadios. [19]

2.2.2. Elastografia onda 2D-cisalhamento (2D-SWE)

Mais recentemente, a tecnologia Real Time Sheare Wave elastografia (SWE) foi desenvolvida, tendo sido obtidos resultados promissores com esta técnica. A 2D-SWE tem a capacidade de apresentar as imagens em tempo real, sendo possível a sua visualização em 2D, o que não é possível com o Fibroscan®. [20] A sua taxa de insucesso é significativamente menor do que a do Fibroscan®, 2,6%, vs 10,4% respetivamente, particularmente em doentes com ascite, mas não em doentes obesos onde se utiliza o Fibroscan® com sonda XL. [43]

Embora não existam estudos de aplicação desta técnica no FGNA, a 2D-SWE é uma técnica promissora que está atualmente sob investigação e que parece ser pelo menos equivalente ao Fibroscan® e ao SWE / ARFI para o estadiamento não invasivo da fibrose hepática na hepatite viral. [19] Tem também a vantagem de poder ser acoplada ao aparelho de ecografia. [52]

Estas técnicas alternativas, a pSWE /ARFI e a 2D-SWE, parecem superar as limitações do Fibroscan®, contudo os critérios de qualidade para a sua correta interpretação continuam por definir. [19]

2.3 Ressonância Magnética (RM)

2.3.1 RM por imagem

A RMI apresenta um grande potencial no diagnóstico e monitorização da esteatose hepática, sendo um método seguro que não utiliza radiações e cujos resultados podem ser reprodutíveis. [9] É mais sensível na deteção de pequenos graus de esteatose, apresentando uma maior correlação com o conteúdo de gordura de uma análise histológica do que os métodos anteriores, quando comparados com a biópsia hepática. [22]

Porém os elevados custos envolvidos neste equipamento tornam-no menos disponível. [15] Outro aspeto que influencia a sua utilização é o espaço confinado a que os indivíduos são sujeitos na realização do exame, tornando esta técnica intolerável para certos doentes obesos. [15]

A “*dual gradient echo magnetic resonance imaging*” (DGE-MRI) é uma nova técnica que permite também o diagnóstico de esteatose, no entanto, por vezes, os resultados são imprecisos e é necessário reconstruir imagens muito complexas para a identificação de esteatose. [28] Em comparação com a TC e a RMS, a DGE-RMI foi o método mais sensível para o diagnóstico e quantificação de esteatose. [28]

2.3.2 Elastografia por Ressonância Magnética (RME)

Este método tem a vantagem de permitir a análise de todo o fígado e tem uma boa aplicabilidade em doentes obesos e com ascite. [10] Contudo é atualmente um método demasiado dispendioso e demorado para a utilização na prática clínica regular, sendo mais adequada para fins de investigação. [41]

Os estudos sugerem que a RME pode ser importante para a deteção de fibrose avançada (F3-F4) em doentes com FGNA e que possivelmente é mais precisa do que o FibroScan® e APRI para o diagnóstico de fibrose significativa (F2-F4) em doentes com doença hepática crónica. [10] Nos estudos realizados até à data, a RME tem demonstrado uma elevada fiabilidade em distinguir doentes com EAHN daqueles com ES, com 94% de sensibilidade e 73% de especificidade, sendo que valores superiores a 4,15 kPa correspondem a estadios de fibrose avançada. [54]

O elevado nível de precisão da RME no diagnóstico de EHNA é independente da inflamação hepática e do IMC. No entanto são necessários mais estudos para efetuar a validação da sua sensibilidade e para estabelecer os limiares de diagnóstico. [55]

2.3.3 Espectroscopia por RM (RMS)

A utilização da espectroscopia de prótons na ressonância magnética auxilia a quantificação do conteúdo lipídico nos hepatócitos. Vários estudos têm demonstrado uma boa correlação entre a gravidade da esteatose hepática dos resultados obtidos com RMS e por biópsia hepática. [22] Este método permite a detecção de pequenas quantidades de lípidos (0,5%) no parênquima hepático, em comparação com a RMI, pelo que é considerado o método mais sensível. [24] Em comparação com a ultrassonografia e a TC, a RMS é melhor na detecção de esteatose e identificação dos seus estádios iniciais. [56] No entanto, não é um método utilizado por rotina pelo longo tempo necessário para a sua execução. [57]

2.4 Tomografia Computorizada (TC)

O FGNA pode ser diagnosticado por TC, sendo possível visualizar uma diminuição da atenuação do fígado em comparação com o baço. Com a TC sem contraste, a sensibilidade para a detecção de esteatose hepática aumenta para 93%. [28] Apesar de ser precisa no diagnóstico de esteatose, a TC não é sensível na detecção de elevações ligeiras a moderadas de conteúdo lipídico hepático. [28] Não sendo um método viável para avaliar a progressão da esteatose e distinguir EHNA de ES. Além disso a TC utiliza radiação ionizante, o que pode limitar a sua utilização, nomeadamente em crianças. [58]

2.5 Coeficiente de Atenuação Controlada (CAP)

O CAP é um novo método que tem sido proposto para identificar esteatose hepática de forma não invasiva. O CAP avalia o grau de atenuação dos ultrassons num fígado gordo permitindo a quantificação da esteatose, utilizando para isso o aparelho de elastografia hepática transitória com a sonda M. [59]

Este método tem a capacidade de quantificar esteatoses superiores a 10% com boa precisão, apresentando uma boa correlação com os graus patológicos da esteatose. [4] Contudo há estudos que referem ser pouco exato em diferenciar graus de esteatose próximos. [22] Por outro lado, a sonda M do CAP não permite identificar com precisão 6%-8% dos doentes com esteatose. [22] Estes resultados foram associados ao sexo feminino, IMC elevado e síndrome metabólica. [22] Com o intuito de ultrapassar esta

limitação tem sido adaptada a sonda XL ao CAP, mas esta abordagem requer mais estudo em doentes obesos para validação dos resultados. [22]

Este método tem a vantagem de ser fácil de executar, não ionizante e os resultados são operadores independentes, ou seja, não dependem da interpretação subjetiva. [4] Além disso é menos suscetível a erros de amostra em comparação com a biopsia hepática, uma vez que avalia 100 vezes mais tecido. [4]

Em comparação com os resultados obtidos pelo SteatoTest, FLI e a RMS, o CAP apresenta valores concordantes com estes métodos na determinação de esteatose. [4] Contudo alguns estudos apresentam resultados contraditórios quando comparado os resultados do CAP com o de SteatoTest na determinação do grau de esteatose. [22] Em relação à EHNA, o número de doentes com ENHA incluídos no estudo que avaliam o CAP é muito pequeno, pelo que é difícil retirar conclusões. [44]

Desta forma são necessários mais estudos com maior número de doentes com EHNA e estudos de comparação com outros métodos para retirar conclusões mais fiáveis. [22].

Perspetivas Futuras

1. Marcadores Genéticos

O estudo de fatores genéticos do FGNA tem sido uma área em crescimento. O estudo do genoma em doentes com FGNA tem demonstrado uma associação de vários genes com o risco aumentado de desenvolver FGNA. Por exemplo, a variante da

codificação do gene PNPLA3 responsável pela formação da I148M (patatin-like phospholipase domain containing-3), foi demonstrada ser um fator de risco genético para a presença de esteatose e de EHNA. [60] Mais recentemente, a variante da codificação do gene TM6SF2 responsável pela codificação da E167K (transmembrane 6 superfamily member 2) também tem sido relacionada com o aumento da probabilidade de desenvolver EHNA e fibrose avançada, embora esteja associada a uma diminuição da incidência de eventos cardiovasculares. [12] Considera-se que a variante do gene E167K inibe a excreção hepática de colesterol e da lipoproteína de baixa densidade (VLDL), aumentando assim a acumulação de lípidos do fígado. [14]

Um outro estudo recente revelou uma correlação positiva entre a expressão de um novo gene S100A9 e a progressão hepática e metabólica da esteatose hepática. [61]

Mais estudos são necessários para determinar a sua validação de modo a que possam ser utilizados na prática clínica recorrente.

2. Glicoproteínas

Em doentes com EHNA, foram também identificados glicoproteínas e outros péptidos que sofrem uma modificação na pós-tradução, uma diminuição da glicosilação, podendo desta forma ser utilizados como biomarcadores. [14] A glicosilação é uma das principais modificações enzimáticas que ocorre a nível hepático, pelo que uma diminuição da função hepática conduz a alterações na glicosilação das proteínas. [16] De acordo com diferentes alterações da N-glycome, dois marcadores, o GlycoCirrhoTest e o GlycoFibroTest, têm se demonstrado importantes para prever cirrose e fibrose, respetivamente. [16] Contudo mais estudos são necessários para validar estes candidatos a biomarcadores. Nestes casos, há ainda problemas em relação aos equipamentos que permitem identificar estes marcadores não só pelo elevado custo como também pela imprecisão em identificar os marcadores. [14]

Em investigação está ainda a relação entre os valores da razão albumina glicosilada (GA) / hemoglobina glicosilada (HbA1c), nos doentes com EHNA. [16] Verifica-se a existência de uma relação entre o aumento da relação GA/HbA1c e a gravidade histológica da fibrose hepática. [16] Podendo ser um possível biomarcador, mas carece de muita mais investigação.

Recentemente foi também demonstrado a combinação de duas glicoproteínas, “fucosylated haptoglobin” (Fuc-Hpt) e “Mac-2 binding protein” (Mac2bp), para

distinguir os doentes com EHNA, apresentado uma sensibilidade e especificidade de 81,1% e 79,3%, respetivamente. [62]

3. Alterações no RNA

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão do gene na transcrição. Alterações nos níveis de miRNAs têm sido associados aos processos fisiopatológicos do desenvolvimento de fibrose, como por exemplo, o aumento dos níveis séricos e hepáticos de miRNA-122 tem sido associado a esteatose, EHNA e fibrose. [63] Fatores ambientais também podem afetar a expressão dos genes pelas vias epigenéticas. [10] Foram identificados em doentes com FGNA, mais de 69.000 locais com alterações na metilação de regiões CpG, responsáveis pela regulação dos processos de metabolismo do ácido gordo, ativação de célula estrelada e reparação de DNA. [63]

Estes métodos têm algumas limitações, como o facto dos métodos que quantificam os miRNAs ou os biomarcadores epigenéticos apresentarem resultados diferentes e estes variarem consoante o tipo de amostra. [63]

4. Micropartículas (MPs)

Uma outra abordagem para o diagnóstico de EHNA são as micropartículas (MPs), pequenas vesículas extracelulares que são libertadas após a desintegração da membrana plasmática a partir de células ativadas ou após a apoptose. [19] Estas partículas que são libertadas para a corrente sanguínea, são essenciais para a comunicação célula-a-célula, e incluem lípidos, proteínas, recetores e RNAs. [18] Nos doentes com EHNA são libertadas MPs resultantes da lesão dos hepatócitos em resposta aos ácidos gordos livres resultantes da lipotoxicidade. Através do estudo destas partículas poderá ser possível a distinção entre EHNA e esteatose hepática simples. [18]

5. Compostos orgânicos voláteis - Testes respiratórios

Outra nova abordagem para o diagnóstico de EHNA é a análise de compostos orgânicos voláteis (COV) expelidos na respiração. Alguns destes compostos são considerados marcadores de stresse oxidativo que podem identificar espécies reativas de oxigénio, derivadas da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados. [20] Um estudo demonstrou que três COV, o n-tridecano, o 3-metil-butanonitrile e o 1-propanol foram suficientes para distinguir doentes com EHNA daqueles sem EHNA. [64] Outro estudo refere também a relação da diminuição dos níveis de C-metionina no ar expirado,

considerado um indicador da função mitocondrial do fígado, com o nível de atividade inflamatória dos doentes com FGNA. [64] São necessários muitos mais estudos para determinar a origem exata destes COV e validar estes dados num grupo mais alargado de doentes. No entanto dada a sua simplicidade e segurança, a análise de ar exalado poderia tornar-se o método inicial para rastreio dos doentes com EHNA. [18]

6. Vias da morfogénese

As vias Wnt, Notch e Hedgehog estimulam as células estreladas e a sua diferenciação em miofibroblastos, sendo estes os responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose hepática nos doentes com EHNA e cirrose. [46] As células que revestem os canalículos biliares são sensíveis à estimulação de ligantes Hedgehog, alterando a sua morfologia e consequentemente a expressão de várias quimiocinas e dos seus recetores, promovendo o recrutamento de células do sistema imunitário para o espaço periportal, como o CXCL16 e de células natural killer (NKT). [23] Os dados existentes sugerem que a ativação da via Hh promove as respostas imunes pró-fibrogénicas, estando os estadios da fibrose correlacionados significativamente com a intensidade da reação inflamatória no EHNA. [65] Verificou-se ainda que a regulação negativa da via Hh melhorava o tratamento da EHNA. [65]

Estudos sobre o esclarecimento de como estas vias são reguladas durante a lesão hepática poderão ter relevância clínica na avaliação da gravidade da fibrose hepática nos doentes com EHNA. [60] Até agora os dados sugerem fortemente que esta via poderá ser um alvo para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, como biomarcadores, e ainda de novos tratamentos para EHNA. [66]

7. Vesículas Extra- Celulares

Actualmente uma área em investigação é a utilização de vesículas extra-celulares como método não invasivo para o diagnóstico de EHNA. As vesículas extra-celulares são mensageiros eficazes da comunicação célula-a-célula, transferindo moléculas ativas para as células-alvo e desta forma modulam a patogénese e progressão da EHNA. [67] A identificação da composição e origem das vesículas extra-celulares nos fluidos biológicos podem vir a ser uma estratégia diagnóstica não invasiva de lesão hepática durante o desenvolvimento de EHNA. [67] Embora os resultados tenham sido bastante favoráveis, ainda há um longo caminho a percorrer para compreender melhor a relação entre os mecanismos fisiopatológicos da EHNA e a libertação de vesículas extra-celulares. [68]

Conclusão

Para o diagnóstico de EHNA, em primeiro lugar devem ser excluídas outras causas de alteração das provas hepáticas ou causas secundárias de esteatose hepática. É também importante avaliar o risco metabólico, a presença de resistência à insulina e o risco cardiovascular, já que esta é a principal causa de morte.

Em relação às provas hepáticas, estas não são métodos fidedignos para avaliar a presença de FGNA nem de EHNA. A maioria dos doentes tem aminotransferases dentro dos valores de referência, sendo que, mesmo os casos de cirrose hepática podem ocorrer sem elevação das aminotransferases. A relação AST/ALT habitualmente é inferior a um, quando superior, deve-se suspeitar de evolução para cirrose.

Os métodos de imagem, como a ultrassonografia abdominal e a TC apresentam grande sensibilidade para o diagnóstico de esteatose, quando esta é superior a 30%. Essa sensibilidade diminui bastante quando infiltração de esteatose é menor. A espectroscopia por RM é o método não invasivo mais sensível para o diagnóstico de esteatose hepática, permitindo a quantificação de forma bastante precisa de concentrações mínimas de esteatose hepática. No entanto, não é um método utilizado por rotina.

Nos últimos anos, tem havido grande investimento no desenvolvimento de marcadores não invasivos de EHNA, tendo sido desenvolvidos vários scores de diagnóstico. Estes scores incluem proteínas de fase aguda, citocinas, marcadores de apoptose e stress oxidativo, mas os resultados foram inconsistentes. O doseamento dos níveis séricos dos fragmentos de citoqueratina 18 (CK18), é o único método que apresenta validação por grupos independentes para identificação dos doentes com EHNA.

Para avaliação não invasiva da fibrose hepática, o NAFLD fibrosis score ou o FIB-4 e o Fibroscan® podem ser utilizados como procedimentos de primeira linha na identificação de doentes com fibrose. Estes permitem a identificação de fibrose avançada (F3-F4), reduzindo a necessidade de biópsia hepática. Por outro lado, outras técnicas de avaliação de elasticidade hepática parecem ser muito promissoras como, o ARFI, a elastografia por RM e a elastografia em tempo real, para a deteção de fibrose significativa (F2-F4). No entanto, a identificação de fibrose significativa é menos precisa com testes não invasivos em comparação com a biópsia hepática e pode necessitar, de acordo com o contexto clínico, de confirmação histológica. A avaliação de seguimento para determinar

a progressão de fibrose do fígado, deve ser realizada tanto por biomarcadores séricos como pelo Fibroscan®, nos doentes com FGNA num intervalo de 3 anos.

Em conclusão, ainda nenhuma combinação de métodos não invasivos permite diagnosticar com precisão EHNA, avaliar a progressão da doença ou diferenciar os estadios intermédios.

Contudo os métodos de diagnóstico de EHNA que assentam na dinâmica dos processos fisiopatológicos como as MPs, os VOCs, os MicroRNAs, as vesículas extracelulares, ou mesmo os testes genéticos são inovadores e bastantes promissores, tendo mostrado um forte potencial.

Com o desenvolvimento de novos métodos prevê-se que o diagnóstico precoce de FGNA em populações de alto risco seja mais eficaz e mais atempado no futuro próximo. O principal objetivo é diagnosticar o mais precocemente possível e avaliar as respostas às opções terapêuticas desta entidade clínica, cuja incidência tem e continuará a aumentar nos próximos anos.

Tabela 1 Vantagens e desvantagens dos métodos não imagiológicos para o diagnóstico de doentes com FGNA.

Métodos não imagiológicos	Vantagens	Desvantagens
	Boa reprodutibilidade; Alta aplicabilidade (95%); Custo reduzido e ampla disponibilidade; Bem validados; Podem ser realizados em ambulatório;	Não específicos do fígado Incapaz de discriminar entre graus intermédios de fibrose; Desempenho não tão bom para o deteção de cirrose; Limitações (síndrome de Gilbert...);

Tabela 2 Vantagens e desvantagens dos métodos imagiológicos para o diagnóstico de doentes com FGNA

Exame	Função	Vantagens	Desvantagens
Ultrassonografia (US) [14]	Identificar esteatose	Rapidamente disponível, barato, fácil de executar e rápido	Não é sensível para esteatose <30%; Medida qualitativa; Ineficaz para EHNA e fibrose avançada; Operador-dependente;
Fibroscan® [14]	Identificação e estadiamento da fibrose; Excluir fibrose avançada;	Técnica amplamente utilizada e validada; Simples (realizada à beira do leito, rápida, fácil de aprender); Critérios de qualidade bem definidos; Boa reprodutibilidade;	Não é preciso para EHNA; Requer um dispositivo especial; Aplicabilidade (80%) inferior aos biomarcadores séricos: obesidade, ascite, experiência do operador; Falsos positivos em caso de: hepatite aguda, colestase extra hepática; congestão hepática; ingestão de alimentos; consumo excessivo de álcool;
ARFI [14]	Identificação e estadiamento da fibrose;	Rápido; Preciso; Pode ser implementada numa máquina de US convencional; Aplicabilidade maior do que TE (ascite e obesidade);	Pouco eficaz em identificar EHNA sem fibrose; Operador-dependente; Critérios de qualidade não estão bem definidos; Incapaz de discriminar graus intermédios de fibrose;
SWE [14]	Identificação e estadiamento da fibrose;	Boa aplicabilidade (rápido e preciso); Imagens em tempo real; Pode ser implementada numa máquina de US convencional; Eficaz em obesos e doentes com ascite;	Ineficaz em identificar EHNA; Critérios de qualidade não estão bem definidos; Validação adicional garantida; Incapaz de discriminar graus intermédios de fibrose;
RMI [14]	Identificação de esteatose;	Sem radiação; Dados reprodutíveis; Sensível na deteção dos graus de fibrose;	Custos elevados; Disponibilidade limitada; Algumas limitações em doentes obesos;
RME [14]	Identificação e estadiamento da fibrose; Identifica doentes com EHNA sem fibrose;	Bastante preciso; Baixa taxa de insucesso; Pode ser implementado num aparelho normal de RM; Exame a todo o fígado; Aplicabilidade maior do que TE (pediatria, obesos, ascite); Sem radiação; Potencialmente indicador de EHNA sem fibrose;	Conhecimentos para análise dos resultados; Demorada; Onerosa; Apenas alguns estudos publicados – validação adicional garantida especialmente em comparação com TE;
RMS [14]	Identificação de esteatose, principalmente dos estadios iniciais;	Sensível a pequenas quantidades de esteatose;	Tempo de execução prolongado;
TC [14]	Identificação de esteatose;	Facilmente disponível; Fácil de executar; Rápido;	Não é preciso para o diagnóstico de EHNA; Exposição à radiação;
CAP [14]	Identificação de esteatose;	Boa correlação com os graus de esteatose;	Limitação em doentes obesos; Mais estudos para avaliação no caso da EHNA;

Tabela 3Scores desenvolvidos para o diagnóstico de esteatose.

Score	Autor	Variáveis	Sensibilidade	Especificidade	AUROC	Validação
SteatoTest (ST)	Poynard T <i>et al.</i> , 2005 [69]	α 2-MG; haptoglobina; apoliproteína A1; bilirrubina total; GGT; glicose; triglicérides; colesterol; ALT; idade; sexo; IMC;	90%	70%	0.79	Validado
Fatty Liver Index (FLI)	Bedogni G <i>et al.</i> , 2006 [70]	IMC; perímetro abdominal; triglicéridos; GGT;	87%	86%	0.84	Estudos epidemiológicos
NAFLD Liver Fat Score	Kotronen A <i>et al.</i> , 2009 [71]	Síndrome metabólica; DM2; níveis de insulina; AST; ALT;	95%	95%	0.87	Validado
Lipid Accumulation Product (LAP)	Bedogni G <i>et al.</i> , 2011 [72]	Perímetro abdominal; triglicéridos	-	-	-	-
Ultrasonographic Fatty Liver Indicator (US-FLI)	Ballestri S <i>et al.</i> , 2012 [73]	Fígado mais brilhante do que o rim, cuja intensidade de contraste pode ser classificada como leve/moderada (2 pontos) ou grave (3 pontos): <ol style="list-style-type: none"> 1. Atenuação posterior dos ultra-som, 2. “Vessel blurring” 3. Dificil visualização da vesícula biliar 4. Dificil visualização do diafragma 5. Área de preservação focal Score ≥ 2 indicam FGNA Score ≥ 4 prevê EHNA	46%	-	0.796	-

Abreviaturas: GGT: gama glutamil transferase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; CK18: citoqueratina 18;

Tabela 4 Scores desenvolvidos para o diagnóstico de esteato hepatite não alcoólica.

Score	Autor	Variáveis	Sensibilidade	Especificidade	AUROC	Validação
NASH Test	Poynard T et al., 2006 [74]	α 2-MG; haptoglobina; apoliproteína A1; bilirrubina total; GGT; ALT; AST; triglicéridos; colesterol; idade; sexo; altura; peso	33%	94%	0.79	
HAIR	Dixon JB et al., 2001 [75]	Hipertensão; ALT>40 IU/L; Resistência à insulina(índice <5) ≥ 2 parâmetros	80%	89%	0.90	
Palekar's Score	Palekar T et al; 2006 [76]	Idade ≥ 50 ; Sexo feminino; AST ≥ 45 IU/L; IMC ≥ 30 Kg/m ² ; AST/ALT ≥ 8 ; nível séricos de ácido hialurónico ≥ 55 ug/L ≥ 3 parâmetros	83%	82%	0.90	
NASH Diagnostic	Younossi ZM et al., 2008 [77]	CK 18 total e fragmentada (M30 e M65); Adiponectina; Resistina;	72%	91%	0.90	
Nice model	Anty R et al., 2010 [78]	ALT; CK18 fragmentos; Síndrome metabólico;	84%	86%	0.83-0.88	

Abreviaturas: α 2-MG: α 2-microglobulina; DM2: Diabetes mellitus tipo 2; GGT: gama glutamil transferase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; TIMP-1: inibidor de tecido da metaloproteinase 1; PIIINP: péptido amino-terminal do pró-colagénio III.

Tabela 5 Scores desenvolvidos para o diagnóstico de Fibrose.

Score	Autor/Ano	Variáveis	Estadio de Fibrose	Valor de Cut-off	Sensibilidad e	Especificidad e	AUROC	Validação
NAFLD fibrosis score (NFS)	Angulo P et al., 2007 [79]	Idade; IMC; DM2; glicémia; AST/ALT; plaquetas; albumina;	F3-F4	≤ -1.455 ≥ 0.676	90% 64%	60% 97%	0.84	Validado
FibroTest (FT)	Ratziu V et al., 2006 [80]	Idade; α 2-microglobulina; bilirrubina total; GGT; apoliproteína A1;	F2-F4 F3-F4	0.30 0.70 0.30	77% 25% 92%	77% 97% 71%	0.75- 0.86	Validado
FibroMeter NAFLD	Calès P et al., 2009 [11]	Glicose; AST; Ferritina; Plaquetas; ALT; Peso; Idade;	F2-F4	≤ 0.611 ≥ 0.715	79%	96%	0.943	Validado
BARD score	Harrison SA et al., 2008 [79]	IMC ≥ 28 Kg/m ² ; AST/ALT ≥ 0.8 ; Diabetes Mellitus	F3-F4	2	72%	64%	0.81	Validado
FIB-4	McPherson S et al., 2009 [81]	Idade; AST; plaquetas; ALT	F3-F4	< 1.30 > 2.67	74% 33%	71% 98%	0.86	Validado
Enhanced Liver Fibrosis (ELF)	Guha IN et al. 2008 [82]	Ácido hialurónico; TIMP-1; PIIINP;	F2-F4 F3-F4	-0.1068 0.3576	70% 80%	80% 90%	0.87	Validado
BAAT	Ratziu V et al., 2000 [17]	Idade ≥ 50 ; IMC ≥ 28 kg/m ² ; Triglicéridos ≥ 1.7 mmol/L; ALT;			14%	100%	0.86	
Hepascore	Kapoor S, et al., 2005 [83]	Idade; Sexo; α 2-MG; ácido hialurónico; bilirrubina; GGT;	F2-F4 F3-F4 F4	0.44 0.37 0.70	50% 75% 87%	88% 84% 89%	91%	Validado
OELF	Rosenberg W et al., 2004 [84]	Idade; Ácido hialurónico; TIMP-1; PIIINP;			89%	96%	0.87	
NAFLD Diagnostic Panel	Younossi ZM et al., 2011 [77]	Diabetes mellitus; triglicéridos; TIMP-1; AST			93%	91%	0.81	

Abreviaturas: α 2-MG: α 2-microglobulina; DM2: Diabetes mellitus tipo 2; GGT: gama glutamil transferase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; TIMP-1: inibidor de tecido da metaloproteinase 1; PIIINP: péptido amino-terminal do pró-colagénio III.

Bibliografia

- [1] Ratziu V., Bellentani S., Cortez-Pinto H., Day C. and Marchesini G. (2010) A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of Hepatology* 53:372-845.
- [2] Angulo P., Machado M. V. and Diehl A. M. (2015) Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Clinical Implications. *Semin Liver Dis* 35:132-145.
- [3] Charlton M. R., Burns R. A., Pedersen J. M., and et. al (2011) Frequency and Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141:1249-1253.
- [4] Machado M. V. and Cortez-Pinto H. (2013) Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease a critical appraisal. *Journal of Hepatology* 58:1007-1019.
- [5] Angulo P. (2010) Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance?. *Hepatology* 51:373-375.
- [6] Treeprasertsuk S., Einer B., Felicity E. and Suwanwalaikorn S. (2013) NAFLD fibrosis score: a prognostic predictor for mortality and liver complications among NAFLD patients. *World J. Gastroenterol* 19: 1219-1229.
- [7] Shen J., Chan H. L.-Y., Wong G. L. and et. al (2012) Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *Journal of Hepatology* 56:1363-1370.
- [8] Williams C. D., Stengel Asike J., Torres M. I., and et. al (2011) Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* 140:124-131.
- [9] Angulo P., Bugianesi E., and Bjornsson E. S. (2013) Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145: 782.
- [10] Asadf S. and Dasf H. M. (2015) NASH, From Diagnosis to Treatment: Where do we stand?. *Hepatology* 62:1652-1655.
- [11] Calès P., Lainé F., Boursier J. and et. al (2009) Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *Journal of Hepatology* 50: 165-173.

- [12] Ekstedt M., Hagstrom H., Nasr P., and et al (2015) Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61:1547-54.
- [13] Castera L. and Pinzani M. (2010) Non-invasive assessment of liver fibrosis: are we ready?. *Lancet* 375: 1419-1420.
- [14] Bedossa P. and Pater K. (2016) Biopsy and noninvasive methods to assess progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 150:1811-1822.
- [15] Castera L., Vilgrain V. and Angulo P. (2013) Noninvasive evaluation of NAFLD. *Gastroenterology* 10: 666-675.
- [16] Enomoto H., Bando Y., Nakamura H., Nishiguchi S. and Koga M. (2015) Liver fibrosis markers of nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology* 21:7427-7435.
- [17] Ratziu V., Grimaldi P., Charlotte F. and et al (2000) Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 118:1117-23.
- [18] Alkhoury N. and Feldstein A. E. (2016) Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver. *Metabolism Clinical and Experimental* 65:1087-1095.
- [19] Castera L., Chan H. L. Y., and Arrese M. (2015) EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of Hepatology* 63:237-264.
- [20] Arulanandan A. and Loomba R. (2015) Non-invasive Testing for NASH and NASH with Advanced Fibrosis: Are We There Yet?. *Curr Hepatol Rep* 14:109-118.
- [21] Tsochatzis E. A. and Bosch J. (2014) Liver cirrhosis. *The Lancet* 383: 1749-1761.
- [22] Castera L., Vilgrain V. and Angulo P. (2013) Noninvasive evaluation of NAFLD. *Gastroenterology* 10:666-675.
- [23] Machado M. V. and Cortez-Pinto H., (2014) Management of fatty liver disease with the metabolic syndrome. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 8:487-500.
- [24] Shen J., Chan H. L.-Y., Wong G. L. H. and Choi P. C. L. (2012) Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *Journal of Hepatology* 56:1363-1370.

- [25] Kruger F. C. and Daniels C. R. (2011) APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S. Afr Med J* 101:477-80.
- [26] Feldstein A. E. and Wieckowska A. (2009) Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* 50: 1072-1078.
- [27] Yang M., Xu D., Y. L. and Guo X. (2015) Combined Serum Biomarkers in Non-Invasive Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLOS one* 6:013166.
- [28] Shen F. F. and LU L. G. (2016) Advance in the noninvasive methods to diagnose nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 17:565-571.
- [29] Manousou P. and Kalambokis G. (2011) Serum ferritin is a discriminant marker for both fibrosis and inflammation in histologically proven non-alcoholic fatty liver disease patients. *Liver International* 31: 730-739.
- [30] Angulo P., George J., Bugianesi E. and et. al (2015) Serum Ferritin Levels Lack Diagnostic Accuracy for Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12:1163-1169.
- [31] Malik R., Chang M. and Bhaskar K. (2009) The Clinical Utility of Biomarkers and the Nonalcoholic Steatohepatitis CRN Liver Biopsy Scoring System in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24:564-568.
- [32] Lee J. H., Kim D., Kim H. J. and et. al, (2010) Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Elsevier* 42:503-508.
- [33] Shen J., Chan H. L.-Y. and Wong G. L.H. (2012) Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers 56:1363-1370.
- [34] Poynard T., Ratzu V. and Albrecht J. (2005) The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comparative Hepatology* 4:10.
- [35] Corey K. E., Lai M., Gelrud L. G. and et. al (2012) Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Biomarker for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10: 651-656.
- [36] Kotronen A., Peltonen M., Hakkarainen A. and et. al, (2009) Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Liver Fat Using Metabolic and Genetic Factors. *Gastroenterology* 137:865-872.

- [37] Ratziu V., Massard J., Charlotte F., and et. al (2006) Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology* 6:6.
- [38] Shah A. G., Lydecker A. and Murray K. (2009) Comparison of Noninvasive Markers of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7:1104-1112.
- [39] Shah A. G., Lydecker A. and Murray K. (2009) Comparison of Noninvasive Markers of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7:1104-1112.
- [40] Adams L. A., Bulsara M., Rossi E. and et. al, (2005) Hepascore: An Accurate Validated Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection. *Clinical Chemistry* 51: 1867-1873.
- [41] Clínica R. d. O. (2015) Recomendações da Orientação Clínica da EASL-ALEH: Testes não invasivos para avaliação da gravidade da doença hepática e do prgnóstico. *Journal of Hepatology* 63:237-264.
- [42] Chalasano N., Younossi Z., Lavine J. E. and et. al. (2012) The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 142:1592-1609.
- [43] Cassinotto C., Lapuyade B., Mouries A. and et. al (2014) Non-invasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: Comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and FibroScan®. *Journaol of Hepatology* 61: 550-557.
- [44] Myers R. P., Pollett A. and Kirsch R. (2012) Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver International* 32: 902-910.
- [45] Ergelen R., Yilmaz Y., Asedow R. and et. al (2016) Comparison of Doppler ultrasound and transient elastography in the diagnosis of significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Abdominal Radiology* 41: 1505-10.
- [46] Byrne C. D. and Targher G. (2015) NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology* 62:S47-S64.

- [47] Parra-Ruiz J., Sanjuán C., Mediana L. M. and et. al (2014) Letter: accuracy of liver stiffness measurement – a comparison of two different FibroScan devices. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 39:1434-1435.
- [48] Boursier J., Zarski J.-P. and Ledinghen V. D. (2013) Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology* 57: 1182-1191.
- [49] Tapper E., Castera L. and Afdhal N. (2015) Fibroscan (Vibration-Controlled Transient Elastography): Where does it stand in the united states practice. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 13:27-36.
- [50] Boursier J., Vergniol J., Guillet A. and et. al (2016) Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis test and liver stiffness measurement by Fibroscan in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 65:570-8.
- [51] Kruger F. C., Daniels C. R. and Kidd M. (2011) APRI: A simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J* 101:477-80.
- [52] Recomendações de Orientação Clínica da EASL-ALEH: Testes não invasivos para avaliação da gravidade da doença hepática e do prognóstico (2015) *Journal of Hepatology* 63: 237–264.
- [53] Braticevici C. F., Sporea I., Panaitescu E. and et al. (2013) Value of Acoustic Radiation Force Impulse Imaging Elastography for Non-invasive Evaluation of Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ultrasound in medicine and biology* 39: 1942-1950.
- [54] Chen J., Talwalkar J. A. and Yin M. (2011) Early Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Using MR Elastography. *Radiology* 259: 749-756.
- [55] Werven J. R. V., Marsman H. A., Nederveen A. J. and et. al (2010) Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy., *Radiology* 256: 159-68.
- [56] Imajo K., Kessoku T., Holanda Y. and et. al (2016) Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology* 150:626-637.

- [57] Wei J. L., Leung. C. F. and Chi-Wang T. (2015) Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Patients: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy. *The American Journal of Gastroenterology* 110: 1306-1314.
- [58] Schenzer N. F., Springer F. and Schraml C. (2009) Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *Journal of Hepatology* 51: 433-445.
- [59] Kim D., Kim W. R., Kim H. J. and et al. (2013) Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States†. *Hepatology* 57:1357-1365.
- [60] Zhang L., Zhang H., You W. and et al (2015) PNPLA3 Polymorphisms (rs738409) and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Risk and Related Phenotypes: a meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* , p. Epub ahead of print January 30:821-9.
- [61] Liu X., Wang Y. and Ming Y. (2015) S100A9: A Potential Biomarker for the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and the Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis, *Plos One* 16: 5161-5179.
- [62] Kamada Y., Ono M., Hyogo H. and et. al (2015) A Novel Noninvasive Diagnostic Method for Nonalcoholic Steatohepatitis Using two Glycobiomarkers. *Hepatology* 62:1433-43.
- [63] Szabo G. and Csak T. (2016) Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. *Digestive Diseases and Sciences* 61:1314-1324.
- [64] Verdam F. J., Dallinga J. W., Driessen A. and et al. (2013) Non-alcoholic steatohepatitis: A non-invasive diagnosis by analysis of exhaled breath. *Journal of Hepatology* 58: 543-548.
- [65] Xie G., Choi S. S., Syn W. K., and et al. (2013) Hedgehog signaling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut* 62:299-309.
- [66] Horn V., Palumbo A., Corsazzo D. and et. al. (2012) Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 64:2724-33.

- [67] Ban L. A., Shackel N. A. and McLennan S. V. (2016) Extracellular Vesicles: A New Frontier in Biomarker Discovery for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 17:376.
- [68] Povero D. and Feldstein A. E. (2016) Novel Molecular Mechanisms in the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Diabetes and Metabolism Journal* 40:1-11.
- [69] Poynard T. and Ratziu V. (2005) The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Hepatology* 4:10.
- [70] Bedogni G. and Bellentani S. (2006) The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology* 6:33.
- [71] Orešič M. and Hyötyläinen T. (2013) Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia* 56:2266-2274.
- [72] Bedogni G., Kahn H. S., Stefano B. and et. al (2010) A simple index of lipid overaccumulation is a good marker of liver steatosis. *Gastroenterology* 10:98.
- [73] Ballestri S., Lonardo A. and Romagnoli D. et. al (2012) Ultrasonographic fatty liver indicator, a novel score which rules out NASH and is correlated with metabolic parameters in NAFLD. *Liver International* 32:1242-1252.
- [74] Poynard T., Ratziu V. and Frederic C. and et. al (2006) Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 6:34.
- [75] Dixon J. B. and Bhathal P. S. (2001) Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology* 121:91-100.
- [76] Palekar N. A. and Naus R. (2005) Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International* 26:151-156.
- [77] Younossi Z. M., Jarrar M., Nugent Clare and et. al (2008) A Novel Diagnostic Biomarker Panel for Obesity-related Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Obesity Surgery* 18:140-1437.
- [78] Anty R., Lannelli A., Patouraux S. and et. al (2010) A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the

diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 32:1315-1322.

- [79] Musso G., Gambino R. Cassader and et. al (2010) Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Hepatology* 43:617-649.
- [80] Ratziu V., Massard J., Charlotte F. and et. al (2006) Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology*, p. 6:6.
- [81] Shah A. G. and Lydecker A. (2009) Comparison of Noninvasive Markers of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7:1104-1112.
- [82] Neasdfuh G. (2008) Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology* 47: 455-460.
- [83] Adams L. A., George J., Bugianesi E. and et. al (2011) Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 26:1536-1543.
- [84] Rosenberg W. M., Voelker M., Thiel R. and et. al. (2004) Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 127:1704-1713.